



Estudio del potencial de la espectroscopia atómica de fuente continua de alta resolución para la detección de nanopartículas.

Autor: Raúl Garde Casasnovas

Director: Martín Resano Ezcaray



Universidad
Zaragoza

18 DE SEPTIEMBRE DE 2015

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DEL GRUPO M.A.R.T.E.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción/antecedentes..... | 1 |
| 2. Objetivos y planteamiento..... | 3 |
| 3. Experimental..... | 4 |
| 3.1. Instrumentación..... | 4 |
| 3.2. Disoluciones estándar y reactivos..... | 4 |
| 3.3. Preparación de las disoluciones de AuNP..... | 5 |
| 3.4. Preparación de disoluciones de AuNP y Au en una muestra real (KEJIM-02)..... | 5 |
| 3.5. Procedimiento de análisis de las muestras..... | 6 |
| 4. Resultados y discusión..... | 7 |
| 4.1. Optimización del programa de temperaturas..... | 7 |
| 4.2. Condiciones alternativas..... | 9 |
| 4.2.1. Utilización de cámara de grafito sin plataforma..... | 9 |
| 4.2.2. Utilización de modificantes de matriz..... | 10 |
| 4.3. Caracterización de AuNP según el tamaño de partícula..... | 12 |
| 4.4. Estudio del LOD y del rango lineal..... | 15 |
| 4.5. Evaluación de la señal en una disolución de Au y AuNP..... | 17 |
| 4.6. Estudio del método en una muestra real..... | 19 |
| 5. Conclusiones..... | 20 |
| 6. Bibliografía..... | 21 |

Resumen

Durante los últimos años la nanociencia ha ido desarrollándose a pasos agigantados siendo uno de los campos de la ciencia e ingeniería de materiales más estudiados debido a las excelentes propiedades de los nanomateriales, relacionados con su relación superficie-volumen, que permiten su utilización en infinidad de aplicaciones. Las nanopartículas de oro, en particular, están siendo muy investigadas por su capacidad como portadoras en la dosificación controlada de fármacos y en nuevos tratamientos contra el cáncer.

La caracterización y determinación de las nanopartículas se realiza mediante diversas técnicas. Sin embargo, ninguna cumple con todas las funciones requeridas, siendo muy común la utilización de técnicas de microscopía electrónica (TEM y SEM) para el cálculo del tamaño medio de partícula, y de el plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS) para la determinación de su concentración, entre otras.

En este estudio se investiga el potencial de la espectroscopía de absorción atómica de alta resolución de fuente continua en horno de grafito para la detección y caracterización de nanopartículas de oro, investigando la diferenciación entre sus señales y las que provienen de iones de oro, así como entre nanopartículas de diferentes tamaños. También se evalúan parámetros analíticos asociados a la señal del analito (límite de detección, intervalo lineal) y se estudia la aplicación del método desarrollado a una muestra real. Los resultados confirman el potencial de esta técnica analítica, que no había sido estudiada con este propósito hasta la fecha.

Abstract

During the last years, nanoscience has been developing by leaps and bounds, being one of the most studied fields in material science and engineering due to the excellent properties of nanomaterials, related to its surface-volume ratio, that allow its use in infinity of applications. Gold nanoparticles, in particular, are being investigated due to its potential as carrier in drug delivery systems and in new cancer treatments.

Nanoparticle characterization and detection is performed using a number of techniques. Nevertheless, none of them provides all the information required. For instance, the utilization of electron microscopy (TEM and SEM) for size particle determination and of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for quantification, among other techniques, is very common.

In this study, the potential of high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectroscopy is evaluated for gold nanoparticle detection and characterization, focusing on its capabilities for differentiating the signals obtained for ions and nanoparticles, as well as for nanoparticles of different sizes. Also, the analytical parameters associated with

the analyte signal (limit of detection, linear range) are evaluated, and the application of the method developed to a real sample is tested. The results confirm the possibilities of this technique, which has not been used for this purpose so far.

.

1. Introducción/antecedentes

La nanociencia se encarga del estudio de materiales a escala nanométrica entre 1 y 100 nm, y la formación y ensamblaje a escala molecular de nanoestructuras 2D y 3D o nanomateriales. En general, las nanopartículas (NPs) pueden clasificarse en materiales basados en carbono y nanopartículas inorgánicas, entre las cuales se encuentran las nanopartículas metálicas.¹ Dentro de este último grupo se encuentran las nanopartículas de oro, que pueden ser sintetizadas con diferentes formas como fibras, esferas o estrellas y son fácilmente funcionalizadas con una multitud de ligandos. La distribución de tamaños en una muestra de nanopartículas no es perfecta, ya que a día de hoy es imposible conseguir nanopartículas con exactamente el mismo número de átomos.

Debido a su tendencia a formar agregados, las nanopartículas han de recubrirse con un estabilizador, como el citrato de sodio o alcanotioles para evitar su coalescencia; además mediante este proceso es posible controlar el tamaño.¹

Estos materiales presentan interesantes propiedades como su estabilidad, inercia y otras relacionadas con su tamaño, así como otras que pueden ser modificadas como sus propiedades electrónicas, magnéticas y ópticas; de estas propiedades derivan sus aplicaciones en campos como la electrónica, la biomedicina y la catálisis. Las nanopartículas de oro presentan una propiedad denominada efecto resonante o resonancia de plasmón superficial, que es causada por la interacción de la luz incidente y los electrones libres del material. Este efecto depende mucho de otras propiedades como el tamaño, la forma, la composición superficial o el estado de agregación.² Esta propiedad permite a su vez la aplicación de nanopartículas para su utilización en sensores bioquímicos que pueden trabajar a través de fibras ópticas obteniéndose límites de detección (LODs) adecuados para la detección y cuantificación de una gran variedad de analitos en muestras de interés clínico y medioambiental.²

La crisoterapia es el término utilizado para el empleo del oro en medicina, este elemento tan apreciado a lo largo de la historia se lleva utilizando con estos fines desde la antigüedad por los egipcios, los indios y los chinos para tratar distintos tipos de enfermedades y dolencias como las úlceras, la sífilis o el reuma. Hoy en día sigue utilizándose de diversas maneras y se sigue investigando en nuevas aplicaciones en este campo. La dosificación controlada de fármacos estudia la capacidad de formar nanoestructuras que contengan un principio activo y que sean capaces de reconocer el tejido diana para que sólo éste sea afectado, dejando el resto del organismo intacto. En este ámbito se están estudiando las posibilidades que ofrecen las nanopartículas

de oro como posible portador y para ello, se requiere que las nanopartículas sean capaces de superar ciertas barreras biológicas como las membranas celulares y el sistema reticuloendotelial. Estos estudios se centran en el tratamiento de enfermedades como el cáncer, y las nanopartículas actúan como vector de otros fármacos, siendo capaces de ser selectivos a ciertos tejidos si su estructura se funcionaliza de forma adecuada.³

Los nanocristales de oro presentan capacidades catalíticas muy interesantes, como en reacciones de oxidación de anilinas aromáticas a compuestos azo aromáticos a través de un catalizador de nanopartículas de oro soportadas sobre dióxido de titanio. Sus propiedades catalíticas dependen de su tamaño, forma y de la interacción entre el óxido metálico y las nanopartículas. Otras reacciones catalizadas por este tipo de nanoestructuras son oxidaciones de CO y de alcanos, y N-desoxigenaciones reductivas.⁴

Por lo tanto todos los motivos expuestos anteriormente, el análisis y caracterización de las nanopartículas es un asunto de interés para la industria y la medicina. La técnica más utilizada para la caracterización de nanopartículas es la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM). Sin embargo, sus dimensiones también pueden ser caracterizadas por otros métodos incluyendo la microscopía de efecto túnel (STM), microscopía de fuerza atómica, dispersión de rayos X a bajo ángulo y difracción de rayos X. TEM además es capaz de proporcionar datos adicionales con el software y detector apropiados como la composición elemental e información química (enlace y actividad redox). La microscopía de fuerza atómica y la microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) son técnicas que permiten obtener imágenes de las muestras bajo condiciones ambientales, no obstante esta última presenta dificultades a la hora de analizar las nanopartículas más pequeñas.¹

La espectroscopía ultravioleta visible puede ser utilizada para determinar la presencia de NPs en disolución y la localización de la banda de plasmón superficial, por lo que también proporciona cierta información sobre su tamaño, estado de agregación y superficie química.¹

Sin embargo, es todavía preciso el desarrollo de nuevas técnicas, idealmente más baratas, rápidas y sencillas, que las microscopías para que sean accesibles a laboratorios de control, y que proporcionen una sensibilidad más elevada que la absorción en el UV-vis.

La técnica utilizada en este trabajo es la espectroscopía de absorción atómica de alta resolución de fuente continua con horno de grafito (HR CS GFAAS). Esta técnica se basa en la formación de una nube de átomos a partir de una muestra líquida o sólida, mediante la aplicación de un programa de temperaturas y así poder realizar la determinación a través de la absorbancia, que se relaciona con la concentración de la muestra mediante la ley de Lambert-Beer. La diferencia principal entre un instrumento convencional y uno de fuente continua es el sistema óptico, ya que la fuente de luz en este caso es una lámpara de arco corto de Xenón que emite en todo el espectro visible y parte del ultravioleta (185-900 nm) en vez de las lámparas de cátodo hueco del elemento a determinar que emiten únicamente a las longitudes de onda del elemento; otra diferencia es el sistema de obtención de luz monocromática, ya que este sistema presenta dos monocromadores, un prisma de difracción y una red en escalera o *échelle*, en lugar de la típica red de difracción. De esta forma es posible obtener información simultánea de varias longitudes de onda y gracias al sistema de detección de estado sólido en *array*, se obtienen espectros 3D con las variables absorbancia, tiempo y longitud de onda. Sin embargo el diseño del instrumento sólo permite monitorizar simultáneamente una pequeña parte del espectro electromagnético (0.2-0.3 nm), pero incluso así este hecho presenta una gran utilidad, ya que permite la detección de posibles interferencias y su corrección de forma más eficiente. El detector consta de un total de 588 píxeles, de los cuales sólo 200 se emplean con fines analíticos, el resto son empleados para corregir eventos espectrales indeseados que puedan ocurrir durante la medida. De esta manera, la medida sólo está limitada por el denominado ruido de disparo, funcionando como un sistema de doble haz. Así se obtienen señales mejor definidas y más diferenciadas respecto a la línea base incluso a niveles de concentración muy bajos, mejorando los límites de detección.^{5, 6}

Hasta la fecha los estudios escasos con nanopartículas de oro mediante GFAAS se han dedicado únicamente a la determinación de su concentración total, asumiendo que todo el oro se encontraba en forma de NPs.⁷ Sin embargo ya se han llevado a cabo estudios de diferenciación entre nanopartículas e iones en muestras con plata^{8,9}; por tanto puede ser de interés el aplicar esta técnica para evaluar su capacidad para poder obtener información diferencial sobre distintos tamaños de nanopartículas de oro en muestras acuosas así como para diferenciarlas de oro iónico para así permitir el desarrollo de nuevas metodologías rápidas para la caracterización de este analito, de gran importancia en la química moderna.

2. Objetivos y planteamiento

Se han descrito una variedad de técnicas utilizadas para la caracterización de nanopartículas, sin embargo el hecho de que existan varias implica que no existe una única técnica aceptable para todos los parámetros que se deben caracterizar; es por

ello que el estudio de la espectroscopía de absorción atómica de fuente continua en horno de grafito para la caracterización y diferenciación de estas muestras puede resultar en una alternativa de interés por su rapidez, capacidad de trabajar con muestras complejas y bajo coste. Para ello durante este estudio se ha tratado de investigar una metodología adecuada para la obtención de señales diferenciadas entre iones y nanopartículas y entre diferentes tamaños de nanopartículas, con las incertidumbres asociadas a las medidas realizadas y a su vez la evaluación del programa propuesto respecto a parámetros más comunes como el límite de detección y rango lineal utilizando patrones de nanopartículas. Por último se ha estudiado la aplicación del método a una mezcla entre iones y nanopartículas y la utilización de éste en una muestra real de agua de un lago canadiense.

3. Experimental

3.1. Instrumentación

Todos los experimentos de este trabajo se llevaron a cabo utilizando un espectrometro de absorción atómica de alta resolución de fuente continua, ContrAA 700, de Analytik Jena equipado con atomizadores de llama y de horno de grafito. El sistema óptico consta de una lámpara de arco corto de xenón, un monocromador doble en escalera o *échelle* de alta resolución y detector de CCD en *array* dotado con 588 píxeles, 200 de los cuales son utilizados para la obtención de la señal analítica y para la corrección del ruido de fondo; el resto sirven para funciones internas como corregir fluctuaciones de la intensidad de la lámpara. La línea atómica más sensible del oro se localiza a 242.795 nm y la resolución por pixel en esta zona espectral es de 1.4 pm. Para realizar las medidas se han empleado tubos de grafito de calentamiento transversal equipados con su correspondiente plataforma.

3.2. Disoluciones estándar y reactivos

El agua purificada utilizada fue obtenida de un sistema Mili-Q (Millipore, Billerica, USA). Las disoluciones de oro iónico fueron preparadas diariamente diluyendo una disolución estándar comercial de 1 g L^{-1} (Merk, Darmstadt, Alemania) con HCl 0.12 M. Las disoluciones de Pd fueron preparadas a partir de una disolución estándar comercial de 1 g L^{-1} (Merk); las de H_2SO_4 fueron preparadas a partir de una disolución concentrada del 98% (Merk). Las disoluciones de cisteína y tiourea fueron preparadas a partir de los correspondientes patrones sólidos (Merk) y fueron disueltas en HCl 0.12 M.

3.3. Preparación de las disoluciones de AuNP

Las muestras de nanopartículas de oro fueron proporcionadas por Nanocomposix (Praga, República Checa). Este tipo de muestras no son totalmente homogéneas, ya que la síntesis no es perfecta y presentan una distribución de tamaños; es por ello que se requiere aportar el diámetro medio de partícula y su incertidumbre asociada, para ello se utiliza la espectroscopía electrónica de transmisión. La concentración exacta fue determinada mediante plasma de acoplamiento inductivo con detección por espectrometría de masas (ICP-MS). Estos datos fueron proporcionados por el fabricante y se muestran en la Tabla 1.

| Muestra | Diámetro de partícula (nm) | desviación estándar (nm) | Concentración (mg/ml) |
|---------|----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| 5 nm | 4.7 | 0.6 | 0.052 |
| 20 nm | 19.6 | 2.1 | 0.051 |
| 50 nm | 49.0 | 11.3 | 0.052 |
| 80 nm | 75.7 | 10.1 | 0.055 |
| 100 nm | 100.0 | 7.4 | 0.052 |

Tabla 1: Disoluciones patrón de Nanocomposix con su tamaño y concentración.

La preparación de muestra fue la mínima posible, se realizaron diluciones en HCl 0.12M. Las muestras de nanopartículas tienden a aglomerarse y a depositarse, por lo que se puede perder concentración en determinaciones a lo largo de los días; es por ello que este tipo de muestras fueron preparadas diariamente previa agitación durante al menos 1 minuto.

3.4. Preparación de disoluciones de AuNP y Au en una muestra real (KEJIM-02)

Se prepararon una serie de disoluciones con una muestra de agua del lago Kejimkujik (Nueva Escocia), un agua de carácter débil a la que se le adicionaron nanopartículas de oro de todos los tamaños descritos hasta concentraciones requeridas para los análisis.

3.5. Procedimiento de análisis de las muestras

La espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito se caracteriza por ser una técnica utilizada para la determinación elemental a nivel traza en multitud de muestras, y es por ello que el trabajo habitual se centra en obtener señales equivalentes independientemente del estado químico-físico del analito y de la matriz. Sin embargo en este trabajo el objetivo es diferente. La idea principal es el desarrollo de una metodología que permita maximizar las posibles diferencias existentes entre diferentes especies de oro. Para ello el estudio se ha centrado en la optimización del programa de temperaturas, en el estudio de posibles modificantes y en la evaluación de diferentes parámetros de la señal, con el fin de encontrar una alternativa más rápida y barata a los métodos de caracterización más habituales hoy en día.

Las principales diferencias químico físicas entre los analitos que se quieren diferenciar son dos: el estado de oxidación y el tamaño de partícula; por lo que el programa de temperaturas que se aplique debe intentar agrandar las diferencias en la señal obtenida en función de esas dos propiedades. Las etapas utilizadas durante el programa son cuatro; una primera etapa de secado, una segunda de pirólisis, una tercera de atomización y una última de limpieza. Teóricamente una muestra iónica y una metálica puede presentar mecanismos de atomización diferentes, ya que su interacción con el grafito y con los modificantes o compuestos que existan en la matriz (en el caso de analizar una muestra real), no tiene por qué ser idéntica. Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas también es un aspecto relevante, ya que, en principio, debería ser más difícil vaporizarlas y atomizarlas cuanto mayor sea su tamaño.

Con estas dos ideas principales el parámetro diferenciador durante la aplicación del programa va a ser la velocidad de atomización. El programa utilizado durante todos los análisis realizados en este trabajo se encuentra en la tabla 2.

| Etapas | Temperatura/°C | Rampa/°C s ⁻¹ | Tiempo de permanencia/s | Flujo de Argón/L min ⁻¹ |
|----------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Secado | 90 | 3 | 20 | 2 |
| Secado | 110 | 5 | 10 | 2 |
| Pirólisis | 300 | 50 | 20 | 2 |
| Pirólisis | 300 | 0 | 10 | 2 |
| Adaptación de gas | 300 | 0 | 5 | 0 |
| Atomización | 2000 | Variable | 10 | 0 |
| Limpieza | 2450 | 500 | 4 | 2 |

Tabla 2: Programa de temperaturas utilizado durante los experimentos.

4. Resultados y discusión

4.1. Optimización del programa de temperaturas

Con el objetivo de obtener señales diferentes entre nanopartículas e iones de oro se aplicaron diferentes rampas durante la etapa de atomización; para ello se prepararon disoluciones de oro iónico de 70 $\mu\text{g/L}$ y de nanopartículas de 50 nm de 50 $\mu\text{g/L}$ diluídas en HCl 0.12M. A la hora de los análisis se utilizaron alícuotas de 10 μl . La idea motriz es que, cuanto más lento sea el proceso de atomización, se proporcionan más facilidades a que los mecanismos de atomización evolucionen de forma diferente en función de las distintas características físico-químicas de los analitos.

Los resultados obtenidos representados en la figura 1, muestran que la forma de las señales difiere considerablemente con respecto a la especie y a la rampa aplicada; los iones aparecen en todos los casos antes que las nanopartículas y presentan siempre un segundo pico anexo, que, al aplicar rampas más altas va desapareciendo, aunque se mantiene una cola mayor. Este segundo pico o “hombro” coincide en el tiempo la señal que se obtiene a partir de las nanopartículas, que siempre proporcionan una señal unimodal bien definida que aparece a tiempos mayores. Todo esto parece indicar que el oro iónico se atomiza mediante dos mecanismos distintos y uno de ellos pasa por una etapa de reducción a oro metálico, seguramente por acción del grafito, haciendo que siempre haya una pequeña proporción de oro iónico que se localice en la región de aparición de las nanopartículas. Iwamoto et al¹⁰ realizaron una investigación sobre la atomización del oro utilizando ácido ascórbico como modificante. En este estudio se discute la aparición de este doble pico y la formación de gases reductores por parte de este modificante, que hacen que el segundo pico aumente todavía más. También evaluaron la influencia de la rampa de atomización, ya que al disminuir la rampa este segundo pico aumenta en detrimento del primero manteniendo el área total de absorbancia constante. Estos datos parecen verificar la hipótesis de un mecanismo alternativo en el que interviene una etapa reductora y verifica la tendencia del oro iónico a dar un segundo pico al disminuir la rampa de atomización. Las señales de las nanopartículas por el contrario aparecen como un único pico, lo que indica un único mecanismo de atomización.

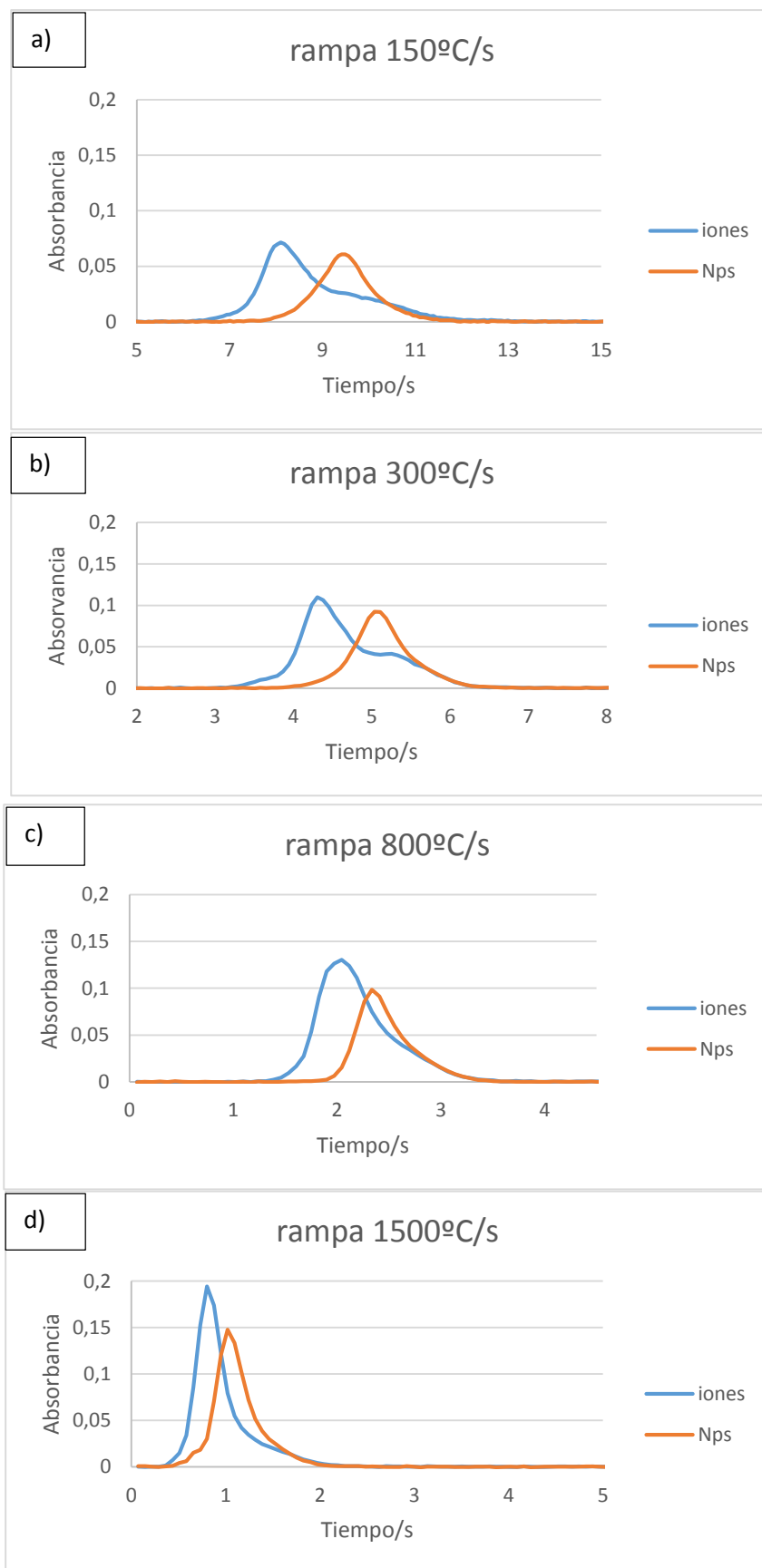


Figura 1: Señales obtenidas al aplicar rampas de a) 150°C/s, b) 300°C/s, c) 800°C/s, d) 1500°C/s.

Al observar los diferentes tiempos de aparición de las señales en los diferentes experimentos realizados (véase la tabla 3) se puede observar que las rampas altas presentan menores diferencias con respecto al máximo, y las rampas más bajas las mayores diferencias. Esto se puede relacionar con el artículo expuesto por Gagne et al⁸ que caracterizaba iones y nanopartículas de plata según la temperatura de atomización. Este parámetro y el tiempo son equivalentes, ya que cuanto menor sea la rampa aplicada más tiempo se precisa para llegar a la temperatura final de atomización.

| rampa/ $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ | t iones/s | t NPs/s | $\Delta t/s$ | σ/s |
|----------------------------------|-----------|---------|--------------|------------|
| 150 | 8.175 | 9.489 | 1.314 | 0.073 |
| 300 | 4.321 | 5.073 | 0.752 | 0.053 |
| 800 | 1.995 | 2.287 | 0.292 | 0.042 |
| 1500 | 0.817 | 0.967 | 0.150 | 0.049 |

Tabla 3: Tiempos de aparición de los diferentes experimentos aplicados, diferencia en tiempo entre éstos e incertidumbre de la diferencia.

En resumen, la utilización de rampas altas proporciona señales más próximas entre los iones y las nanopartículas y conforme la rampa va disminuyendo las señales van apareciendo más tarde, obteniéndose mayores diferencias entre las dos especies. Si bien en ningún momento se consigue una separación perfecta, debido al segundo pico que caracteriza el oro iónico, el método permite detectar diferencias entre las especies de forma rápida, pudiéndose aplicarse como método de *screening*.

4.2. Condiciones alternativas

4.2.1. Utilización de cámara de grafito sin plataforma

A pesar de los buenos resultados obtenidos, se evaluó la posibilidad de utilizar cámara de grafito sin plataforma para estudiar si fuera posible mejorarlos. Normalmente, el uso de plataforma está recomendado ya que favorece una atomización a una temperatura más homogénea y minimiza efectos de la matriz. Sin embargo, en el caso estudiado en este trabajo este hecho no es necesariamente positivo, ya que la diferente distribución de la temperatura podría aumentar las diferencias entre los

analitos. Para estudiar este aspecto se volvieron a utilizar las disoluciones preparadas para el experimento anterior y se aplicaron diferentes rampas de 150°C/s, 1800°C/s, 2200°C/s y 2500°C/s. Las rampas altas fueron evaluadas para comprobar si en estas condiciones las separaciones cambian o siguen la misma tendencia que al utilizar plataforma.

Al aplicar la rampa de 150°C/s las diferencias encontradas entre iones y nanopartículas fueron menores que en caso de utilizar plataforma. Sin embargo ahora el hombro que muestra la señal del oro iónico no concuerda exactamente con la señal de las nanopartículas y la reproducibilidad es muy pobre en cuanto a la forma de la señal, pero sí es reproducible en cuanto al máximo de la señal. Las diferencias en cuanto al tiempo de aparición fueron del orden de 0.57s, mucho menores que en el experimento con plataforma, en que se conseguían diferencias de más de 1 segundo.

Las rampas elevadas mostraron señales muy anchas y debido a esto, las señales de los iones y las nanopartículas prácticamente se superponían, impidiendo el poder diferenciarlas, por lo que la aplicación de rampas altas en cámaras de grafito no es una opción viable a la hora de maximizar diferencias.

En resumen, se concluyó que es preferible utilizar plataforma de grafito también para este tipo de aplicación.

4.2.2. Utilización de modificantes de matriz

Para intentar mejorar la separación obtenida durante la optimización se planteó el uso de diferentes modificantes de matriz, que pudieran interaccionar de forma diferente con las especies implicadas. Entre ellos se utilizaron diferentes moléculas que presentan átomos de azufre: cisteína, tiourea y ácido sulfúrico, ya que es un elemento que presenta una gran afinidad por el oro. Por otro lado, también se estudió el uso de paladio, que es el más utilizado para realizar determinaciones de oro independientemente de su estado químico-físico⁵, si bien es previsible que su empleo tienda a modificar los mecanismos de atomización igualándolos.

El empleo de los modificantes citados durante los análisis no consiguió mejorar los resultados mostrados en la sección 4.1. Siguen apreciándose diferencias entre las señales en el caso de emplear cisteína, tiourea o ácido sulfúrico, pero no son mayores ni las señales de oro iónico aparecen mejor definidas. Por otro lado, en el caso de utilizar paladio las diferencias desaparecen por completo dando señales equivalentes

para las nanopartículas y los iones. Esto indica claramente que el paladio es capaz de interaccionar con las nanopartículas y los iones de la misma manera, produciéndose la atomización de ambos mediante el mismo mecanismo. Thomaidis et al¹¹ estudiaron los mecanismos de atomización del oro en presencia y ausencia de diferentes modificantes. Estos investigadores postularon que el oro interacciona con la cámara de grafito a través de sitios activos formando átomos dispersos y una vez estos sitios disminuyen la atomización se lleva a cabo a través de átomos dispersos. La energía de atomización requerida depende de la masa de oro introducida, indicando que la atomización tiene lugar en agregados cuyos tamaños son mayores cuanto mayor es la masa de oro adicionada. Esta hipótesis puede justificar un proceso de atomización mediante dos mecanismos siempre que haya suficiente oro ocupando los sitios activos de la cámara de grafito. Sin embargo, la presencia de una gran cantidad de átomos metálicos como el paladio, a su vez, ocupa los sitios activos de la superficie del grafito y disuelven el oro en su estructura metálica, inhibiendo la interacción entre el oro y el grafito y haciendo que éste atomice de forma independiente a su forma físico-química, dando lugar siempre a señales gaussianas.

La utilización de los tres modificantes con azufre presentan además una reproducibilidad muy baja mostrándose señales muy dispares entre las distintas réplicas siendo de nulo interés para este estudio. La utilización del paladio por el contrario, proporciona una gran reproducibilidad, y es por ello que su empleo para la cuantificación de oro total es muy deseable. Sin embargo, su función es contraria a la buscada en este estudio en concreto, como bien puede apreciarse en la figura 2, por lo que no se empleó en el resto del trabajo.

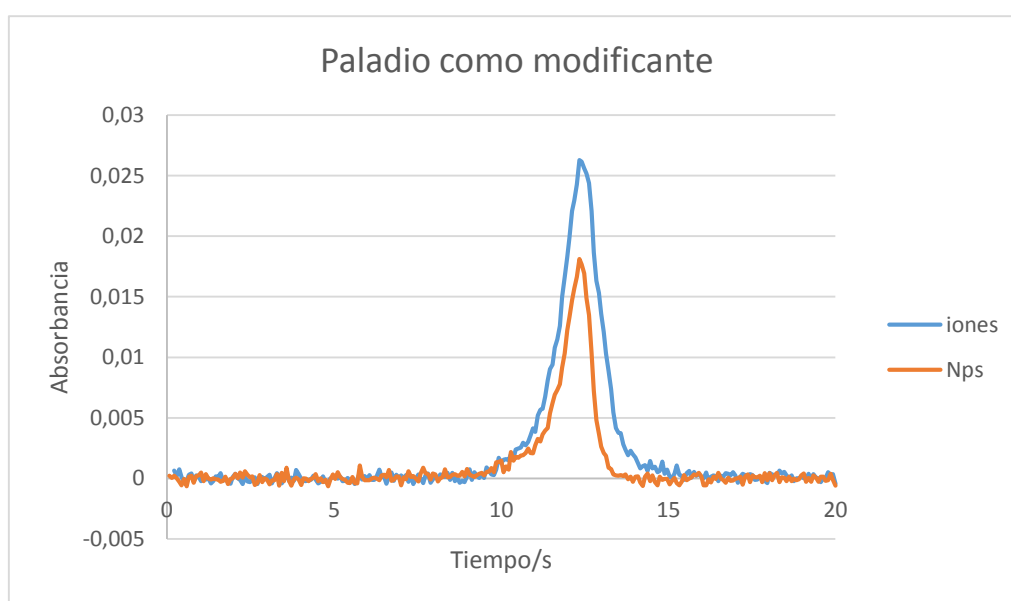


Figura 2: señales de nanopartículas e iones de 50 y 70 $\mu\text{g/L}$ respectivamente al utilizar paladio como modificador de matriz.

4.3. Caracterización de AuNP según el tamaño de partícula

Para evaluar el potencial de esta técnica y las diferencias obtenidas se realizaron una serie de experimentos para estudiar las diferencias entre nanopartículas de diferentes tamaños. Las nanopartículas utilizadas presentaban tamaños medios de 5, 20, 50, 75 y 100 nm; también se realizó sobre una muestra de oro iónico tomando como dato de tamaño su diámetro iónico. Todas las muestras se diluyeron hasta 70 µg/L, sin embargo la de 5 nm y la de 100 nm presentan una absorbancia inferior, posiblemente a una aglomeración durante el proceso de dilución, por lo que tienen una concentración ligeramente inferior a la esperada.

Se estudiaron tres parámetros principales para evaluar cuál de ellos permite establecer diferencias de manera más fiable: el tiempo del máximo de la señal, la pendiente con la que aumenta la señal de absorbancia (pendiente de subida de la señal a partir de ahora) y la anchura de la señal de absorbancia medida a un valor que corresponde con la mitad del máximo de absorbancia, o anchura a media altura.

La evaluación de los tiempos (figura 3) muestra que las señales aparecen más tarde al aumentar el tamaño de partícula. Como se ha comentado anteriormente, este hecho es perfectamente lógico, ya que debe resultar más costoso energéticamente vaporizar y atomizar nanopartículas de mayor tamaño. Además, al representar los datos se pueden observar dos tendencias lineales perfectamente definidas, la primera para las muestras menores de 20 nm con una mayor pendiente y la segunda para mayores de dicho tamaño, con menor pendiente; esto nos indica que las diferencias mostradas entre nanopartículas son más acusadas para partículas de menor tamaño y también que se puede determinar aproximadamente el tamaño de nanopartícula de una muestra desconocida a partir del tiempo del máximo de la señal, lo que puede ser de gran interés. El dato utilizado para incluir los iones es el del máximo de pico, ignorando el hombro que aparece a tiempos mayores que, como ya se ha comentado, corresponde al oro atomizado mediante una etapa previa de reducción.

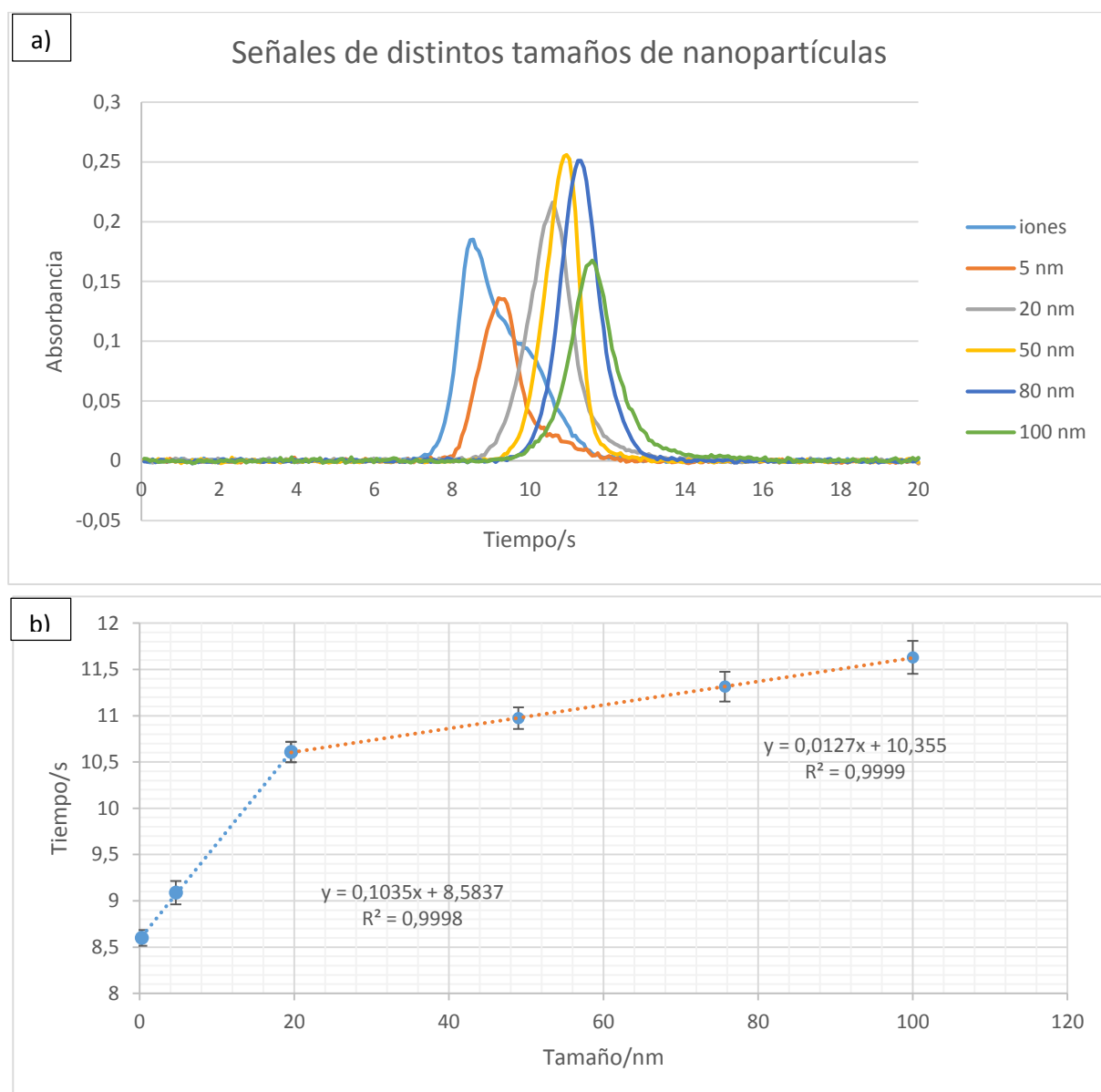


Figura 3: a) Representación conjunta de las distintas absorbancias respecto del tiempo de las señales obtenidas de las disoluciones de distintos tamaños b) Media e incertidumbre asociada a dichos máximos.

La pendiente de subida de la señal es el segundo parámetro de interés durante este experimento. Para evaluarlo se tomaron las señales de forma individual y se consideraron 50 puntos en la zona central de esta subida (semialtura) que siempre proporcionaron una recta con coeficiente de regresión superior a 0.9. Se evaluaron todas las nanopartículas utilizadas hasta el momento, pero no se emplearon las señales obtenidas de las disoluciones iónicas debido a que éstas presentan picos dobles y son mucho más irreproducibles. Los resultados obtenidos permitieron vislumbrar una tendencia ascendente conforme aumenta el tamaño de partícula, como se muestra en la Figura 4. Sin embargo las incertidumbres asociadas a las medidas

hacen de este parámetro poco útil, ya que en el mejor de los casos la desviación estándar relativa es ligeramente inferior al 20%, llegando en alguna medida hasta casi un 30%.

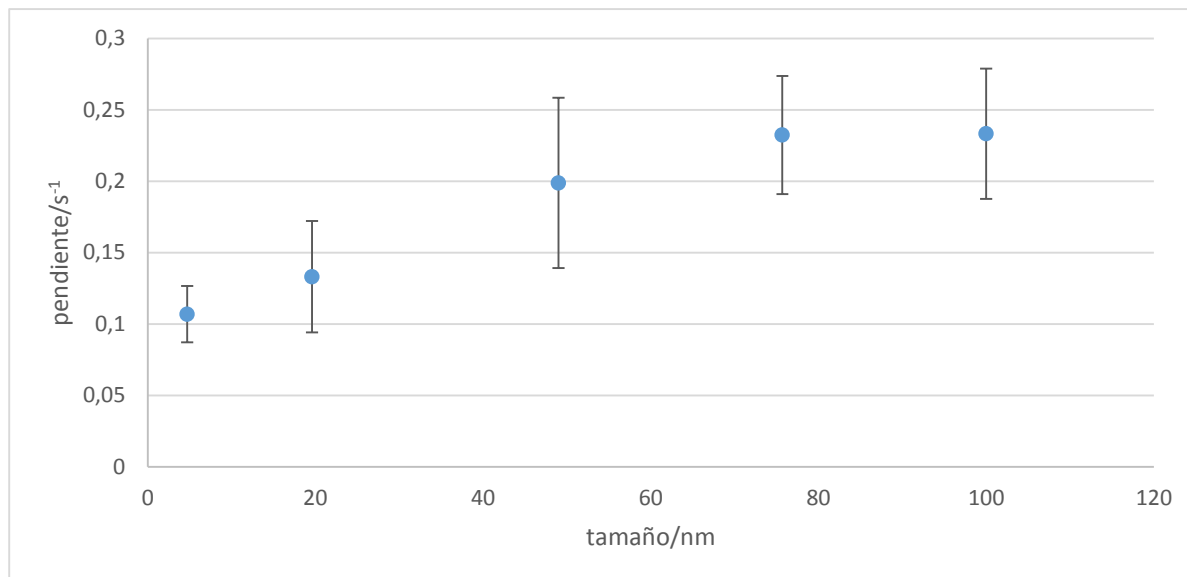


Figura 4: Representación de la pendiente de subida de pico respecto al tiempo con su incertidumbre asociada.

Al igual que en el estudio para la pendiente, al evaluar la anchura de pico a media altura tampoco se han utilizado los datos del oro iónico y sólo se han tratado los datos de las diferentes nanopartículas. La anchura de pico sin embargo no ha mostrado ningún tipo de diferencia en estas disoluciones ya que todos los datos presentan valores muy próximos entre sí, independientemente del tamaño de partícula, tal y como se muestra en la Figura 5. También se comprobó si existía alguna relación con la incertidumbre en el tamaño de nanopartícula, ya que una disolución de nanopartículas con mayor variación en tamaño podría presentar señales más anchas; sin embargo no se encontró ninguna correlación entre estas dos variables y se observaron datos sin ningún tipo de tendencia.

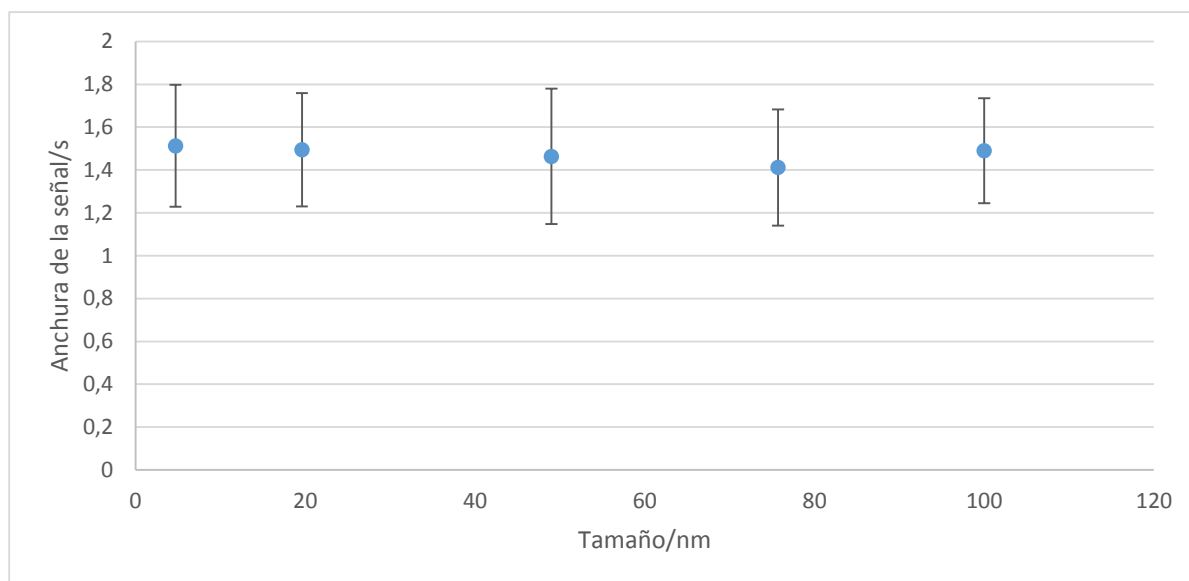


Figura 5: Representación de la anchura de la señal a media altura respecto del tamaño de nanopartícula; los valores observados no se diferencian entre sí estadísticamente.

4.4. Estudio del LOD y del rango lineal

La realización de este estudio desde un punto de vista analítico requiere de la evaluación de otros parámetros más comunes en este ámbito bajo las condiciones en las que se han llevado los experimentos; es por ello, que el límite de detección y el rango lineal también deben ser incluidos en este trabajo. Para la evaluación de estos parámetros se prepararon distintas disoluciones de diferentes concentraciones de una disolución de nanopartículas de 75 nm con HCl 0.12M.

Según la IUPAC, el LOD se calcula al multiplicar la desviación estándar del blanco por tres y dividirla por la sensibilidad, y es un parámetro que permite evaluar la concentración mínima detectable por el método utilizado. Para obtener este dato se realizaron doce medidas de una disolución de HCl 0.12M en ausencia del analito, obteniéndose un LOD de 5.5 pg (0.55 µg/L si se emplean 10 µL de muestra), este valor permite realizar la caracterización incluso en concentraciones traza, lo cual es importante debido a las aplicaciones relacionadas con el analito en cuestión.

Como se muestra en la Figura 6, el rango lineal obtenido con disoluciones de concentraciones de 5, 20, 70, 100, 150, 250 y 1000 µg/L permite distinguir dos regiones, un rango lineal hasta 70 µg/L, con mayor pendiente, y otro rango de menor pendiente desde los 70 hasta los 1000 µg/L. Esto quiere decir que la sensibilidad del

método es superior a concentraciones muy bajas, y a partir de cierto valor es menor y no se modifica hasta concentraciones relativamente elevadas. Este comportamiento se ha observado para otros analitos.¹²

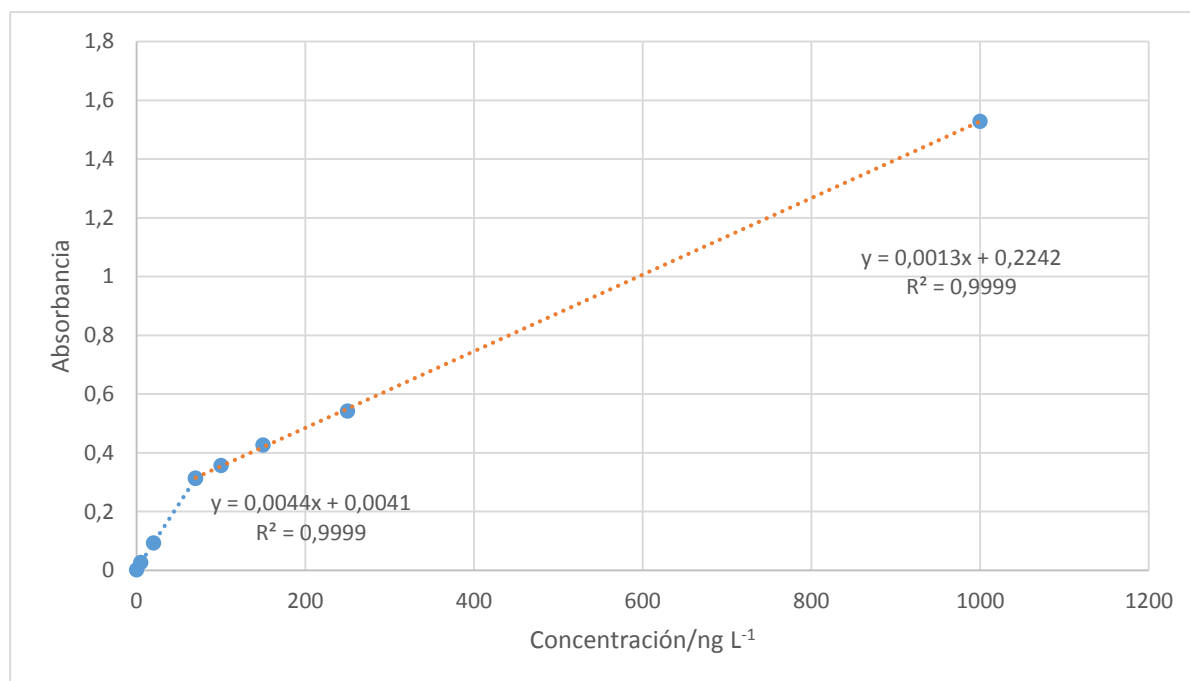


Figura 6: Rango lineal obtenido mediante la dilución de un patrón de nanopartículas de oro de 75 nm. Se observan dos rangos lineales, el primero hasta 70 $\mu\text{g/L}$ y el segundo que llega hasta 1 $\mu\text{g/L}$.

Utilizando las señales obtenidas en este estudio se evaluaron los efectos sobre los parámetros utilizados hasta ahora: tiempo, pendiente y anchura. Esto permitió observar que el tiempo del máximo es un parámetro constante para el tamaño e independiente de la concentración, pero tanto la pendiente como la anchura sí que son parámetros dependientes de ésta; aumentando ambos conforme la concentración de analito es mayor (véase la Figura 7). Este hecho confirma que el único parámetro adecuado para diferenciar especies iónicas y NPs, o NPs de diferentes tamaños, es el tiempo de aparición del máximo.

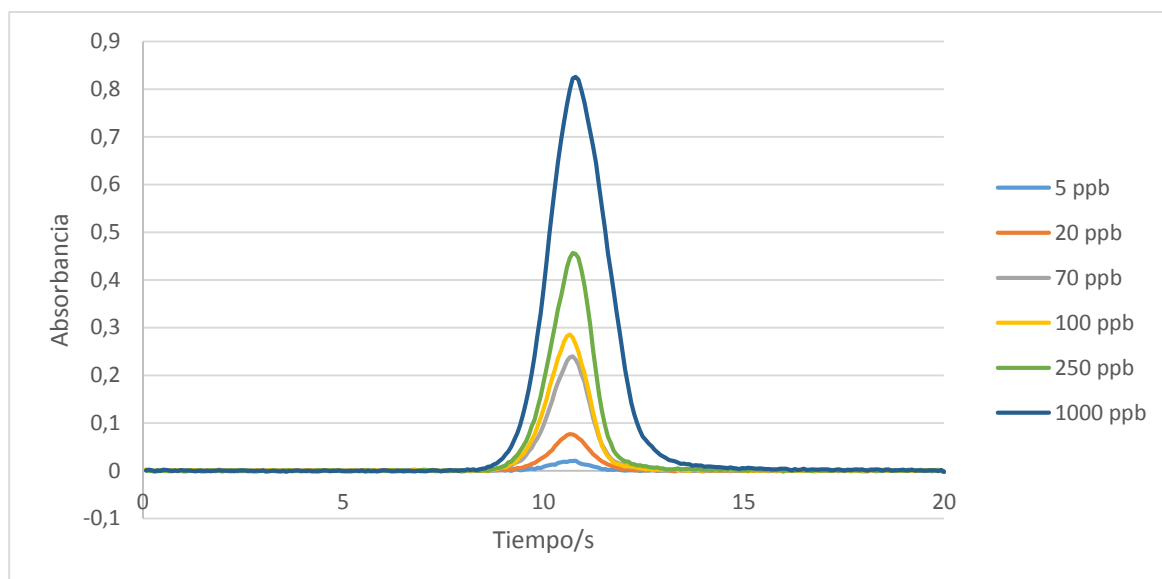


Figura 7: Señales de las disoluciones de diferentes concentraciones de nanopartículas de 75 nm.

4.5. Evaluación de la señal en una disolución de Au y AuNP

Como ya se ha visto, se consiguen apreciar diferencias entre señales de una muestra con oro iónico y otra con oro en forma de nanopartículas, pero es importante evaluar si esas diferencias se mantienen y se pueden apreciar en una muestra con mezcla de ambos analitos; para ello se realizaron diversas réplicas de oro iónico y nanopartículas de disoluciones de 70 $\mu\text{g/L}$ utilizando 10 μl , para poder comparar las señales con las obtenidas al introducir en la cámara mezclas de 5 μl de ambas disoluciones a la vez.

Los resultados mostrados en la Figura 8 indican que se pueden diferenciar dos picos claramente definidos, el primero que correspondería al máximo producido por el oro iónico y el segundo correspondería en su mayoría a las nanopartículas y a la parte del oro iónico que es atomizado previa reducción. Las señales iónicas presentan una gran irreproducibilidad y la proporción entre los dos picos que aparecen en estas muestras es variable, lo que dificulta la interpretación cuantitativa de las mezclas y sólo permite realizar una interpretación cualitativa.

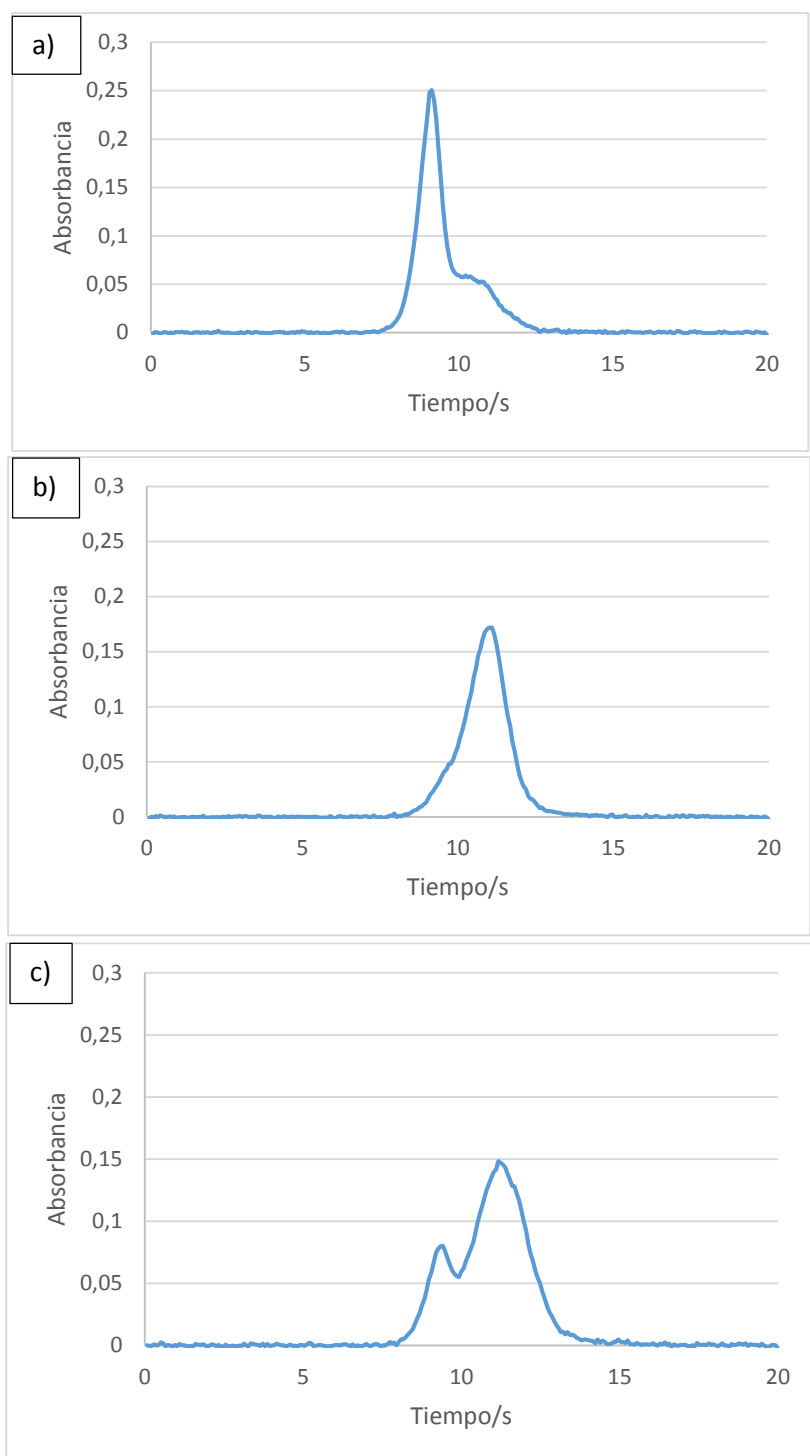


Figura 8: Representación de absorbancia frente al tiempo de: a) Muestra de oro iónico, b) muestra de nanopartículas de oro de 75 nm y c) muestra compuesta por las disoluciones a y b.

4.6. Estudio del método en una muestra real

El comportamiento estudiado hasta ahora se ha realizado sobre una matriz acuosa en la que no hay ninguna interferencia debido a la ausencia de otras especies. Sin embargo, a la hora de poder aplicar esta metodología ha de evaluarse su validez en una muestra de matriz más compleja. Para ello se realizaron una serie de experimentos en los que se evaluaron el tiempo del máximo de pico, la pendiente de subida, y la anchura a media altura en una matriz acuosa del lago Kejimkujik, en Canadá, un agua de matriz simple, pero que permite realizar una primera evaluación sobre una muestra real, en presencia de otros iones y de materia orgánica. El objetivo de este experimento es verificar que los resultados obtenidos hasta ahora siguen las mismas tendencias a pesar de encontrarse en presencia de otras especies químicas.

Los tres parámetros estudiados presentan la misma tendencia en la muestra de agua Kejim que se observaba en los patrones acuosos preparados; los tiempos del máximo aumentan conforme aumenta el tamaño de nanopartícula pasando por un punto de inflexión en torno a los 20 nm, como puede apreciarse en la figura 9. La pendiente de subida de pico sigue una tendencia ascendente y la anchura de pico a mitad de altura de las señales siguen siendo estadísticamente iguales, ambos parámetros con incertidumbres en torno al 20 y 30%, por lo que el método no presenta interferencias en este tipo de muestras. Sin embargo y para posibles estudios posteriores sería recomendable realizar evaluaciones sobre matrices más complejas para evaluar su efecto. En este ámbito se han realizado algunos estudios sobre caracterización de nanopartículas de plata mediante espectroscopía de absorción atómica de atomización electrotérmica con fuente continua en matrices sólidas como peces o plantas^{8, 9}; sin embargo no existe todavía ningún estudio referente al oro.

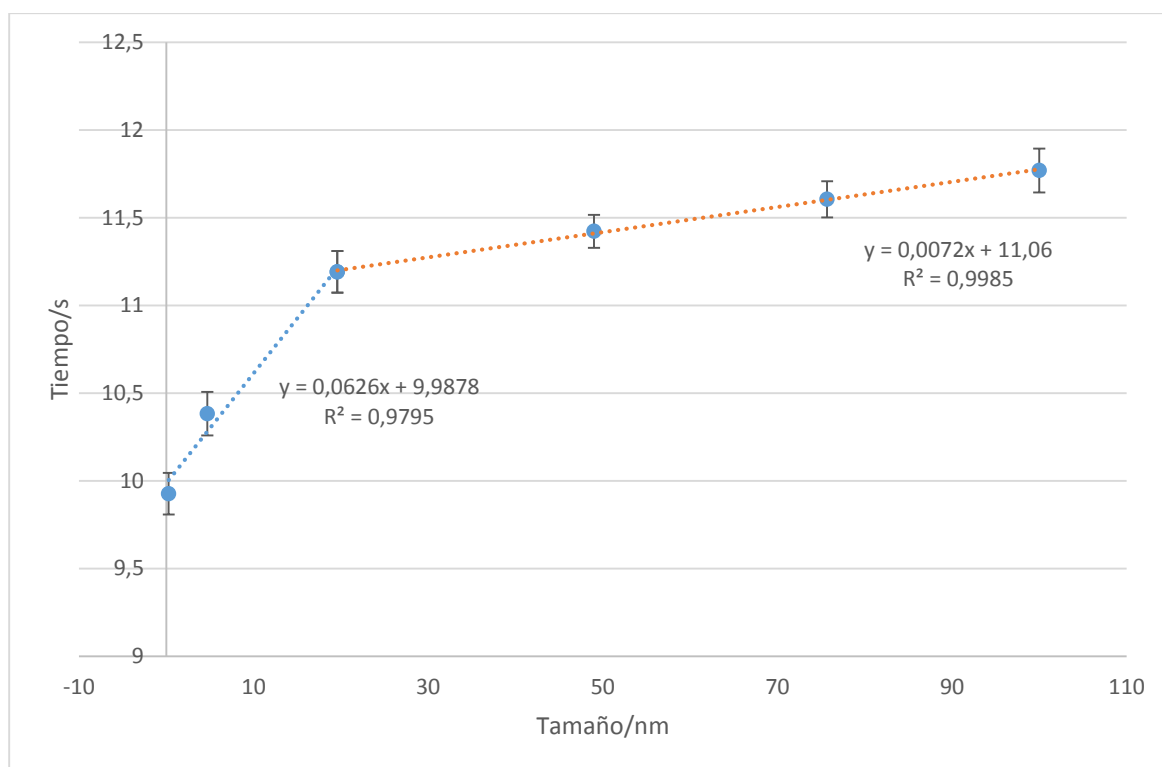


Figura 9: Tiempo del máximo y su incertidumbre de las distintas nanopartículas según su tamaño. Las nanopartículas fueron añadidas a una muestra de agua del lago Kejimkujik con una concentración de 70 µg/L.

5. Conclusiones

La utilización de la espectroscopía de alta resolución de fuente continua en horno de grafito para la diferenciación y caracterización de nanopartículas de oro permite obtener diferencias apreciables entre iones y nanopartículas en muestras acuosas, incluso en mezclas de las mismas. Sin embargo la escasa reproducibilidad de la forma de las señales obtenida para el oro iónico y la presencia de dos mecanismos de atomización diferentes impiden la cuantificación simultánea de iones y nanopartículas, siendo únicamente posible su identificación si se encuentran en concentraciones similares.

Los modificantes de matriz estudiados no mejoran los resultados obtenidos, siendo uno de los aspectos a estudiar en posibles investigaciones, ya que podrían permitir una mayor reproducibilidad en las medidas y una mayor diferenciación entre especies.

El método si permite diferenciar claramente entre iones y NPs de diferentes tamaños de en disoluciones en los que se encuentre presente una única especie mediante la utilización del tiempo del máximo de pico con una incertidumbre aceptable, siendo mayores las diferencias cuanto más pequeñas son las partículas analizadas. El método proporciona un límite de detección de 5.5 pg y un rango lineal que se extiende a casi tres órdenes de magnitud. La utilización de la pendiente de subida de pico y la anchura a media altura no permiten obtener resultados concluyentes.

El estudio sobre una muestra real del lago Kejim vislumbra resultados equivalentes a los encontrados en los patrones acuosos preparados, mostrando que no presenta efectos matriz en este tipo de muestras; el estudio del método en otras muestras deberá realizarse en trabajos posteriores para evaluar con mayor exhaustividad posibles interferencias.

6. Bibliografía

1. Y. Ju-Nam, J. R. Lead. *Science of the total environment*. **2008**, 400, 396-414.
2. C. Caucheteur, T. Guo, J. Albert. *Anal Bioanal Chem*. **2015**, 407, 3883-3897.
3. P. C. Chen, S. C. Mwakwari, A. K. Oyelere. *Nanotechnology, Science and Applications*. **2008**, 1, 45-66.
4. X. Hong, C. Tan, J. Chen, Z. Xu, H. Zhang. *Nano Research*. **2015**, 8 (1), 40-55.
5. M. Resano, M. Aramendia, M. A. Belarra. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2014**, 29, 2229–2250.
6. M. Resano, M. R. Flórez, E. García- Ruiz. *Anal Bioanal Chem*. **2014**, 406, 2239–2259.
7. M. Resano, E. Mozas, C. Crespo, J. Briceño, J. del Campo Menoyo, M. A. Belarra. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, 25, 1864-1873.
8. F. Gagné, P. Turcotte, C. Gagnon. *Anal Bioanal Chem*. **2012**, 404, 2067-2072.
9. N. S. Feichtmeier, K. Leopold. *Anal Bioanal Chem*. **2014**, 406, 3887-3894.
10. E. Iwamoto, M. Itamoto, K. Nishioka, S. Imai, Y. Hayashi, T. Kumamaru. *J. Anal. At. Spectrom.* **1997**, 12, 1293-1296.
11. N. S. Thomaidis, E. A. Piperaki. *Spectrochimica Acta Part B*. **1999**, 54, 1303-1320.
12. B. Welz, L. M. G. dos Santos, R. G. O. Araujo, S. C. Jacob, M. G. R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross. *Spectrochimica Acta Part B* 65. **2010**, 258–262.